

中国秋海棠属 (秋海棠科) 植物的 DNA 条形码评价*

焦丽娟^{1,2}, 税玉民^{1**}

(1 中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650201;

2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 秋海棠属植物种类繁多, 形态变异多样, 导致种类的系统放置混乱, 近缘种类鉴定困难。利用 DNA 条形码实现物种快速准确的鉴定技术具有不受形态特征约束的优势, 为秋海棠属植物的分类鉴定提供了新的方法。本研究选择 4 个 DNA 条形码候选片段 (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS) 对中国秋海棠属 26 种 136 个个体进行了分析。结果显示: 叶绿体基因 *rbcL*, *matK* 和 *trnH-psbA* 种内和种间变异小, 对秋海棠属植物的鉴别能力有限; ITS/ITS2 种内和种间变异大, 在本研究中物种正确鉴定率达到 100%/96%, 可考虑作为秋海棠属 DNA 条形码鉴定的候选片段。研究结果支持中国植物条形码研究组建议将核基因 ITS/ITS2 纳入种子植物 DNA 条形码核心片段中的观点。

关键词: 秋海棠属; DNA 条形码; ITS; *matK*; *rbcL*; *trnH-psbA*

中图分类号: Q 781, Q 949

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2013)06-715-10

Evaluating Candidate DNA Barcodes among Chinese *Begonia* (Begoniaceae) Species

JIAO Li-Juan^{1,2}, SHUI Yu-Min^{1**}

(1 Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,

Kunming 650201, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Begonia* is the biggest genus in the Begoniaceae and exhibits high morphological and ecological diversity, making intrageneric classification and species delimitation difficult, especially in the case of closely related species. In this respect, DNA barcoding has the advantage of achieving rapid species identification without relying on morphological characteristics, once a database containing species-specific sequences is established. In this study, we tested four candidate plant barcoding regions, including three chloroplast loci (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) and one nuclear locus (ITS), in 136 samples representing 26 species of *Begonia*. The results demonstrated that species identification based on *rbcL*, *matK* and *trnH-psbA* sequences was poor due to low interspecific variation. Conversely, ITS/ITS2 sequences showed significant intra- and interspecific divergence enabling a high level of species discrimination (96%–100%). Consequently, ITS/ITS2 could be considered as a potential barcode for identifying *Begonia* species, which supports the proposal by the China Plant BOL Group that ITS/ITS2 should be incorporated into the core barcode for seed plants.

Key words: *Begonia*; DNA barcoding; ITS; *matK*; *rbcL*; *trnH-psbA*

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是利用一个或少数几个短的标准 DNA 片段实现物种快速和准确识

* 基金项目: 中国科学院大科学装置开放研究项目 (2009-LSF-GBOWS-01); 中国国家自然科学基金 (NSFC40830209, 3170174); 中国科学院独立研究项目 (KSCX2-EW-J-24)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: ymshui@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2013-03-26, 2013-07-12 接受发表

作者简介: 焦丽娟 (1988-) 女, 在读硕士, 主要从事秋海棠属分子生物学研究。E-mail: jiaolijuan@mail.kib.ac.cn

别和鉴定的一项技术 (Hebert 等, 2003a, b; Savolainen 等, 2005; Hollinsworth, 2011)。线粒体基因 *COI* (*cytochrome oxidase subunit I*) 已经成功应用于动物界大多数类群的鉴定 (Hebert 等, 2003a, 2004), 但在植物中线粒体基因进化速率慢 (Kress 等, 2005), 并且植物界进化过程复杂, 杂交和多倍性现象普遍, 为寻找标准的植物 DNA 条形码的工作带来了极大的挑战 (Rieseberg 等, 2006; Fazekas 等, 2009), 尤其是对一些近缘种或近期演化物种 (Yan 等, 2011)。

近年来, 植物 DNA 条形码的研究工作集中于从单亲遗传的叶绿体基因组和变异较大的核基因组中寻找理想的植物 DNA 条形码, 并相继提出了不同的片段组合方案。生命条形码联盟植物工作组 [GBOL Plant Working Group (2009)] 建议将 *rbcL* 和 *matK* 组合作为陆地植物 DNA 条形码核心条码; 此后, *trnH-psbA* 和 ITS 被建议作为补充候选片段 (Hollinsworth 等, 2011)。中国植物条形码研究组通过对 1757 种 6286 个植物样品的综合分析, 建议将核基因 ITS/ITS2 纳入种子植物 DNA 条形码核心片段中 (Li 等, 2011)。随后, 高连明等 (2012) 根据植物 DNA 条形码研究的特点, 提出了植物 DNA 条形码研究的标准规范, 为我国植物 DNA 条形码研究提供了详细的参考资料。李德铎等 (2012) 以 DNA 条形码为核心, 首次提出构建新一代植物志 (iFlora) 的理念, 即将现代植物学、DNA 测序技术与信息技术相结合, 通过系列关键技术的集成和攻关, 构建便捷、准确识别植物和掌握相关数字化信息的新一代植物志, 它将极大地促进植物分类学和系统发育、演化生物学、生态学、生物地理学和保护生物学等相关学科的发展。

秋海棠属 (*Begonia* L.) 是一个泛热带分布的大属, 全世界约有 1 500 种, 以美洲和亚洲种类居多, 各占 600 种左右 (Sosef, 1994), 中国有 9 组, 约 150 余种, 主要分布于我国西南、华南各省 (Shui 等, 2002), 该属绝大部分的种类分布具有明显的局域性, 属下各个组也往往限定于某一洲, 甚至是某一地区。秋海棠属植物形态变异复杂, 性状受环境影响较大, 不同的种类在习性、生境、体态、叶形、叶色及花色等方面表现出多样性, 即使同一种类的不同居群, 在某些

性状上的变异也比较显著 (Thompson 和 Thompson, 1981), 且近年来秋海棠属不断有新种、自然杂交种发表 (Shui 等, 2002; Ku 等, 2004, 2006, 2008; Shui 和 Chen, 2005; Peng 等, 2005a, b, 2007, 2008a, b), 因此在属、组以及种类的划分处理上存在着许多争议, 尤其近缘种类难以鉴定。同时该属大多是多汁草本植物, 传统方法压制成的标本, 在叶片颜色、花纹、毛被颜色和花被片颜色等方面都有很大程度的失真, 果实和子房的形态解剖学特征 (子房室数、胎座类型和胎座裂片数) 等属下分组不可缺少的重要诊断特征, 在多汁的果实被压干以后很难准确观察, 也是造成秋海棠属分类系统有些混乱的原因之一。DNA 条形码技术仅需生物体的一部分组织就可实现对物种的快速鉴定, 而所取组织可以来自于生物体的任何部位、甚至可能实现使用来自保存较好的标本, 为秋海棠属植物的分类鉴定提供了很好的辅助方法。

本文应用植物 DNA 条形码四个候选片段 (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* 和 ITS) 对中国秋海棠属植物进行了研究, 评价其 PCR 扩增和测序成功率, 种内种间差异及物种鉴定能力, 筛选出适合秋海棠属的候选 DNA 条码。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采集分布于中国云南、广西以及越南的秋海棠属植物 26 种, 每种不同采集地点按照居群大小间隔 3 ~ 5 m 采集 1 ~ 7 个个体, 共获得 136 个个体。标本存放于中国科学院昆明植物研究所标本馆 (KUN), 详细采集信息见附录 1 (详见: <http://journal.kib.ac.cn/UserFiles/File/JLJ.pdf>)。

1.2 实验方法

选取硅胶干燥或新鲜叶片, 采用改良的 CTAB 法提取总 DNA (Doyle 和 Doyle, 1987)。PCR 扩增采用 20 μ L 的反应体系, 包括正反向引物各 0.5 μ L (0.5 μ M), 模版 DNA 1 μ L (30 ~ 50 ng), dd H₂O 7.5 μ L, 4% 二甲基亚砜 (DMSO) 0.5 μ L, 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 10 μ L [天根 (天根生化科技, 北京); Taq 聚合酶 0.1 U, dNTP 0.5 mM, Tris-HCl (pH8.3) 20 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM]。引物序列及扩增反应程序见表 1。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 ExoSAP-IT 纯化酶 (Affymetrix Inc.) 进行纯化, 7 μ L 反应体系: 5 μ L PCR 产物和 2 μ L 10 倍稀释的纯化酶, 纯化反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 15

min 纯化, 80 ℃ 15 min 使纯化酶失活, 4 ℃ 停止。ABI 3730 XL 自动测序仪进行正反向引物双向测序, 反应程序为: 94 ℃ 预变性 10 s; 96 ℃ 变性 10 s、50 ℃ 退火 5 s、60 ℃ 延伸 4 min, 共 32 个循环; 4 ℃ 停止。

1.3 数据分析

本研究对单个条形码片段: *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, ITS 和 ITS2 (于 ITS 片段中截取); 叶绿体片段的组合: *rbcL+matK*, *rbcL+matK+trnH-psbA*; 以及包含 ITS 片段的所有组合: ITS+*rbcL*, ITS+*matK*, ITS+*trnH-psbA*, ITS+*rbcL+matK*, ITS+*rbcL+trnH-psbA*, ITS+*matK+trnH-psbA*, ITS+*rbcL+matK+trnH-psbA* 进行了分析。如果某个种的个体数小于 2 个, 则此种在分析中被去除, 且在构建联合矩阵时, 如果某个体有缺失数据, 此个体也被去除。应用 Sequencher 4.1.4 软件 (Gene Codes) 完成序列编辑和拼接, 应用 MAFFT 7.0 的 G-INS-i 算法完成比对并做部分手工调整 (Katoh 等, 2005; Katoh 和 Toh, 2008)。应用 MEGA 4.3 (Tamura 等, 2007) 计算变异位点 (Variable sites)、信息位点 (Parsimony-informative sites) 和 K2P 距离 (Kimura 2-parameter distances), 结合一般的统计软件完成呈现种内、种间遗传距离分布频度的 “Barcoding gap” 图。应用 SPSS 16.0 (SPSS 公司, 芝加哥, IL) 完成 Wilcoxon 秩和检验, 评价不同条码种内、种间距离的差异显著性。

应用建树方法对物种鉴定能力进行评价。邻接法

(Neighbor-joining trees, NJ) 构建基因树, 采用 K2P 距离模型 (K2P distance model) 和配对剔除法 (pairwise deletion), 在 MEGA 4.3 中运行, 自展分析 (Bootstrap analysis) 1 000 次抽样, 根据抽样自展值 (Bootstrap value, BS) 评估分支的可靠性。NJ 树上同种的个体聚成一支且支持率 (自展值) $\geq 50\%$ 则认为正确鉴定到种。

2 结果

2.1 PCR 扩增和测序成功率

136 个个体中, *matK*, *trnH-psbA* 和 ITS 的 PCR 扩增成功率分别为: 68.1%、89.9% 和 77.5%, *trnH-psbA* 的扩增成功率较高, *matK* 和 ITS 的扩增成功率较低。*matK*, *trnH-psbA* 和 ITS 的测序成功率 (测序后获得高质量的序列且正反向序列顺利拼接即判定为成功) 分别为: 95.7%、94.4% 和 90.7%。最终分别获得 *matK*, *trnH-psbA* 和 ITS 序列 90、115 和 95 条, 另由 GenBank 上获得 3 条 ITS 序列。对于 *rbcL*, 于 30F 和 1400R 引物扩增得到的 *rbcL* 序列全长中截取 DNA 条形码要求的 *rbcL* 序列 41 条, 剩余 95 个个体获得 *rbcL* 序列 54 条, PCR 扩增和测序成功率分别为: 61.1% 和 93.1%, 共获得 *rbcL* 序列 95 条。

表 1 实验引物和 PCR 扩增反应程序

Table 1 Primers and PCR amplification conditions used in this study

候选片段 DNA region	引物 Primer pairs	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	扩增反应程序 Thermocycling conditions	文献来源 Source
<i>trnH-psbA</i>	trnH	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	94 ℃ 4 min; [30 cycles: 94 ℃ 1 min;	Tate and Simpson, 2003
	psbA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	52 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min]; 72 ℃ 10 min	Sang <i>et al.</i> , 1997
ITS	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	94 ℃ 4 min; [30 cycles: 94 ℃ 1 min;	White, 1990
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	55 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min]; 72 ℃ 10 min	White, 1990
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -1F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT	94 ℃ 4 min; [30 cycles: 94 ℃ 1 min;	Fay <i>et al.</i> , 1997
	<i>rbcL</i> -724R	CAT GTA CCT GCA GTA GC	52 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min]; 72 ℃ 10 min	Fay <i>et al.</i> , 1997
	<i>rbcL</i> -30F	AGC AAG TGT TGG ATT CAA AG	94 ℃ 4 min; [30 cycles: 94 ℃ 1 min;	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	<i>rbcL</i> -1400R	CRG CMG CTA GTT CRG GAC TC	52 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min]; 72 ℃ 10 min	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>matK</i>	3F	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G	94 ℃ 4 min; [30 cycles: 94 ℃ 1 min;	Hollingsworth <i>et al.</i> , 2009
	1R	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	52 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min]; 72 ℃ 10 min	Hollingsworth <i>et al.</i> , 2009

2.2 序列多样性特征

四个候选片段和 ITS2 的序列特征如表 2 所示, 三个叶绿体片段 *rbcL*, *matK* 和 *trnH-psbA* 的变异/信息位点个数分别为: 13/12、12/12 和 11/8。ITS 比对后的长度为 867 bp, 变异/信息位点数为 272/245 个, 占比对长度的 31.4/28.3%。ITS2 比对后的长度为 427 bp, 变异/信息位点数为 142/134 个, 占比对长度的 33.3/31.4%。有 5 个个体 (40782-1, D-33-1, D-38-6, GBOWS1236-1, GBOWS1236-2) 的核基因 ITS 序列中发现 1 个套峰, 1 个个个体 (31397) 有 2 个套峰。其中, 除个体 31397 序列中的 1 个套峰出现在 ITS1 序列内, 其余 6 个套峰均出现在 ITS2 序列内, 这些位点使用简并碱基代替进行分析。

2.3 种内和种间距离

由种内种间 K2P 距离得到 “barcoding gap” 分布图结果显示 (图 1), 核基因 ITS/ITS2 存在 “barcoding gap”, 但不明显, 有小部分的重叠, *rbcL*, *matK* 和 *trnH-psbA* 不存在 “barcoding gap”。Wilcoxon 秩和检验结果显示四个候选片段以及 ITS2 的种内距离变异不显著, 种间距离变异差异大小顺序为 ITS2>ITS>*rbcL*>*matK*>*trnH-psbA* (表 3, 4)。

2.4 物种鉴定有效性

2.4.1 建树方法 NJ 树结果显示三个叶绿体片段的物种鉴定能力不高: *rbcL* 鉴定 2 种, *matK* 鉴定 4 种, *trnH-psbA* 鉴定 4 种, 物种鉴定率分别为: 9.5%, 20%, 17.4%; *rbcL* 和 *matK* 联合分析鉴定 3 种, 物种鉴定率为 18.8%; 三个

叶绿体片段联合分析鉴定 4 种, 物种鉴定率为 28.6% (表 5)。核基因 ITS 的物种鉴定率为 100%, 23 种秋海棠全部正确鉴定, 且除黄氏秋海棠 (*B. huangii* Y. M. Shui & W. H. Chen) 的支持率为 79% 外, 其他 22 种支持率都在 90% 以上 (图 2), 包含 ITS 的片段联合分析 (ITS+*rbcL*, ITS+*matK*, ITS+*trnH-psbA*, ITS+*rbcL*+*matK*, ITS+*rbcL*+*trnH-psbA*, ITS+*matK*+*trnH-psbA*, ITS+*rbcL*+*matK*+*trnH-psbA*) 的物种鉴定率同样都是 100%。ITS2 的物种鉴定率与 ITS 相比因癩叶秋海棠 (*B. leprosa* Hance) 的支持率未达到 50%, 物种鉴定率降为 95.7%, 其它各种的支持率也有所下降, 23 种秋海棠中有 4 种的支持率未达到 90%, 黄氏秋海棠的支持率最低, 为 55% (图 2)。

3 讨论

3.1 DNA 条形码引物通用性

在引物通用性方面, *trnH-psbA* 扩增成功率较高, *matK* 和 ITS 扩增成功率较低 (表 2), 这与以往的研究结果相符 (Kress 等, 2005; Chase 等, 2007; Kress 和 Erickson, 2007; Lahaye 等, 2008a; Newmaster 等, 2008; Ren 等, 2010)。尽管本文对四个候选片段的 PCR 反应条件进行了优化, 其扩增成功率依然较低, 测序成功率也未达到 100% (表 2), 这可能是因为样品 DNA 模板的质量较差或实验技术方面的问题。因此, 四个候选条码在秋海棠属植物中的引物通用性是否偏低或者有其特殊性还需要进一步探索。

表 2 四个候选片段序列多样性特征比较

Table 2 The comparisons of characteristics of the four candidate DNA regions

参数 Parameters	候选片段 Candidate DNA regions				
	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	ITS	ITS2
No. sampled species (individuals)	21 (97)	20 (90)	23 (115)	23 (98)	23 (98)
PCR success/%	61.05	68.12	89.86	77.54	—
Sequencing success/%	93.10	95.74	94.35	90.65	—
Aligned length (size, bp)	545 (540–545)	759 (759)	304 (286–300)	867 (676–698)	427 (282–327)
No. of variable/parsimony informative sites	13/12	12/12	11/8	272/245	142/134
Indel length/bp	1–5	—	1–14	1–20	1–20
GC (range, %)	44.4	32.6	20.8	58.3	58.5
Total overlap (% observation)	0.81	0.26	2.96	8.59	4.44
90% Overlap (% observation)	0.75	0.26	2.96	0.23	1.63
Mean interspecific distance	0.005±0.002	0.003±0.002	0.003±0.002	0.075±0.010	0.082±0.017
Mean intraspecific distance	0.0007±0.0005	0.0004±0.0003	0.0009±0.0007	0.0039±0.0012	0.0023±0.0012

表 3 不同片段种间变异的 Wilcoxon 秩和检验

Table 3 Wilcoxon two-related-samples tests of interspecific divergence among DNA markers

W+	W-	相关等级 Relative ranks		N 值 N-value	P 值 P-value	结果 Result
ITS	matK	W+ = 7260	W- = 0	120	$P \leq 0.001$	ITS>matK
ITS	trnH-psbA	W+ = 11781	W- = 0	153	$P \leq 0.001$	ITS>trnH-psbA
ITS	rbcL	W+ = 9316	W- = 0	136	$P \leq 0.001$	ITS>rbcL
ITS	ITS2	W+ = 7124	W- = 23257	253	$P \leq 0.001$	ITS<ITS2
ITS2	matK	W+ = 7260	W- = 0	120	$P \leq 0.001$	ITS2>matK
ITS2	trnH-psbA	W+ = 11781	W- = 0	153	$P \leq 0.001$	ITS2>trnH-psbA
ITS2	rbcL	W+ = 9316	W- = 0	136	$P \leq 0.001$	ITS2>rbcL
matK	trnH-psbA	W+ = 3948.5	W- = 1616.5	136	$P \leq 0.001$	matK>trnH-psbA
matK	rbcL	W+ = 636.5	W- = 4413.5	120	$P \leq 0.001$	matK<rbcL
trnH-psbA	rbcL	W+ = 1900	W- = 14390	210	$P \leq 0.001$	trnH-psbA<rbcL

表 4 不同片段种内变异的 Wilcoxon 秩和检验

Table 4 Wilcoxon two-related-samples tests of intraspecific divergences among DNA markers

W+	W-	相关等级 Relative ranks		N 值 N-value	P 值 P-value	结果 Result
ITS	matK	W+ = 35	W- = 10	16	0.139	ITS=matK
ITS	trnH-psbA	W+ = 42	W- = 3	18	0.021	ITS=trnH-psbA
ITS	rbcL	W+ = 33	W- = 12	17	0.214	ITS=rbcL
ITS	ITS2	W+ = 62	W- = 29	23	0.249	ITS=ITS2
ITS2	matK	W+ = 21	W- = 7	16	0.237	ITS2=matK
ITS2	trnH-psbA	W+ = 31	W- = 5	18	0.069	ITS2=trnH-psbA
ITS2	rbcL	W+ = 24	W- = 12	17	0.401	ITS2=rbcL
matK	trnH-psbA	W+ = 6	W- = 22	17	0.176	matK=trnH-psbA
matK	rbcL	W+ = 2	W- = 26	16	0.043	matK=rbcL
trnH-psbA	rbcL	W+ = 5	W- = 10	21	0.500	trnH-psbA=rbcL

表 5 NJ 树分析得到叶绿体片段及其组合正确鉴定的物种（支持率≥50%）

Table 5 Species discrimination (bootstrap value ≥50%) of three chloroplast loci and their combination based on the NJ tree

种名 Taxa	候选片段 Candidate DNA regions				
	rbcL	matK	trnH-psbA	LK	LKH
Section I. <i>Coelocentrum</i> Irmsch.					
<i>B. biflora</i>	64	88	—	94	94
<i>B. guangxiensis</i>	—	—	—	55	51
<i>B. zhengyiana</i>	—	64	—	—	—
Section II. <i>Diploclinium</i> (Lindl.) A. DC.					
<i>B. cavaleriei</i>	—	66	68	64	65
Section III. <i>Leptosae</i> (T. C. Ku) Y. M. Shui					
<i>B. cylindrica</i>	64	—	64	—	—
Section IV. <i>Platycentrum</i> (Klotzsch) A. DC.					
<i>B. megalophyllaria</i>	—	—	63	—	60
Section V. <i>Reichenheimia</i> (Klotzsch) A. DC.					
<i>B. parvula</i>	—	72	53	—	—

Note: LK (rbcL+matK), LKH (rbcL+matK+trnH-psbA)

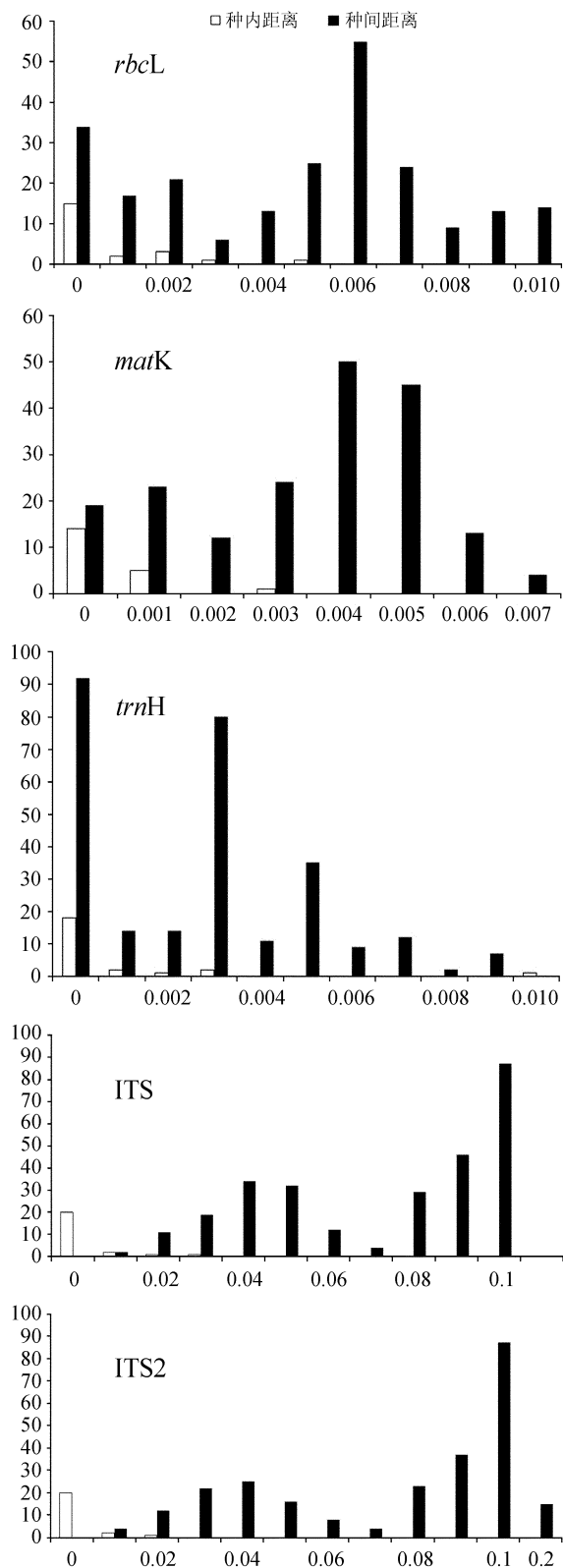


图1 不同候选片段种内和种间 K2P 距离分布图

Fig. 1 Relative distribution of the intraspecific and interspecific distances Kimura 2-parameter (K2P) distances for each locus

3.2 物种分辨率的评价

以往部分研究结果显示三个叶绿体片段在某些类群中具有较高的引物通用性和正确鉴定率 (Kress 等, 2005, 2009; Kress 和 Erickson, 2007; Fazekas 等, 2008; Lahaye 等, 2008a, b; Newmaste 等, 2008; Hollingsworth 等, 2009), 2009 年, 生命条形码联盟植物工作组提出将 *rbcL* 和 *matK* 作为陆地植物 DNA 条形码核心候选片段 (CBOL Plant Working Group, 2009)。在秋海棠属中, 三个叶绿体片段不存在 “barcoding gap” (图 1), 种内、种间距离较小, 物种正确鉴定率低于 20%, *rbcL*+*matK* 和三个片段联合分析的物种正确鉴定率不超过 30% (表 5), 这可能是由于三个叶绿体片段在秋海棠属中进化速率慢、谱系分化不完全或是秋海棠属自身物种分化时间短等生物学原因导致, 这种情况在石斛属 (*Dendrobium* Sw.; 黄海等, 2010) 以及中国生命条形码联盟 (Li, 2011) 研究的 115 属中的 14 个属的植物种类中也存在。

核基因 ITS 片段种内变异和种间变异最大, 存在 “barcoding gap”, 单片段及包含有 ITS 片段的联合分析物种正确鉴定率高达 100%, 能很好地区分秋海棠属的不同种类, 可考虑作为秋海棠属 DNA 条形码鉴定的标准条码。以往的研究结果显示, ITS 片段在眼子菜科 (Potamogetonaceae; Du 等, 2011)、女贞属 (*Ligustrum*; Gu 等, 2011) 和蒴蒾薯属 (*Tacca*; 赵月梅和张玲, 2011) 中的物种分辨率也达到 100%, 在其它科属中也具有最高的物种分辨率 (Altschul 等, 1990; Kress 等, 2005; Sass 等, 2007; Liu 等, 2010; Ren 等, 2010; Shi 等, 2011; Xiang 等, 2011; Fu 等, 2011; Guo 等, 2011; Yan 等, 2011)。因此, 在物种分辨率方面 ITS 片段作为 DNA 条形码具有明显的优势, 但其引物通用性较低、存在 poly-A 结构、序列多拷贝且变异位点众多导致比对困难是其作为秋海棠属 DNA 条形码的主要限制因素, 类似的结果在以前的研究中也出现过 (赵丽嘉等, 2010; 赵月梅和张玲, 2011; Alvarez 和 Wendel, 2003; Bailey 等, 2003; Kress 等, 2005; Chase 等, 2007; Kress 和 Erickson, 2007; Sass 等, 2007; Lahaye 等, 2008b; Gonzalez 等, 2009; CBOL Plant Working Group, 2009;

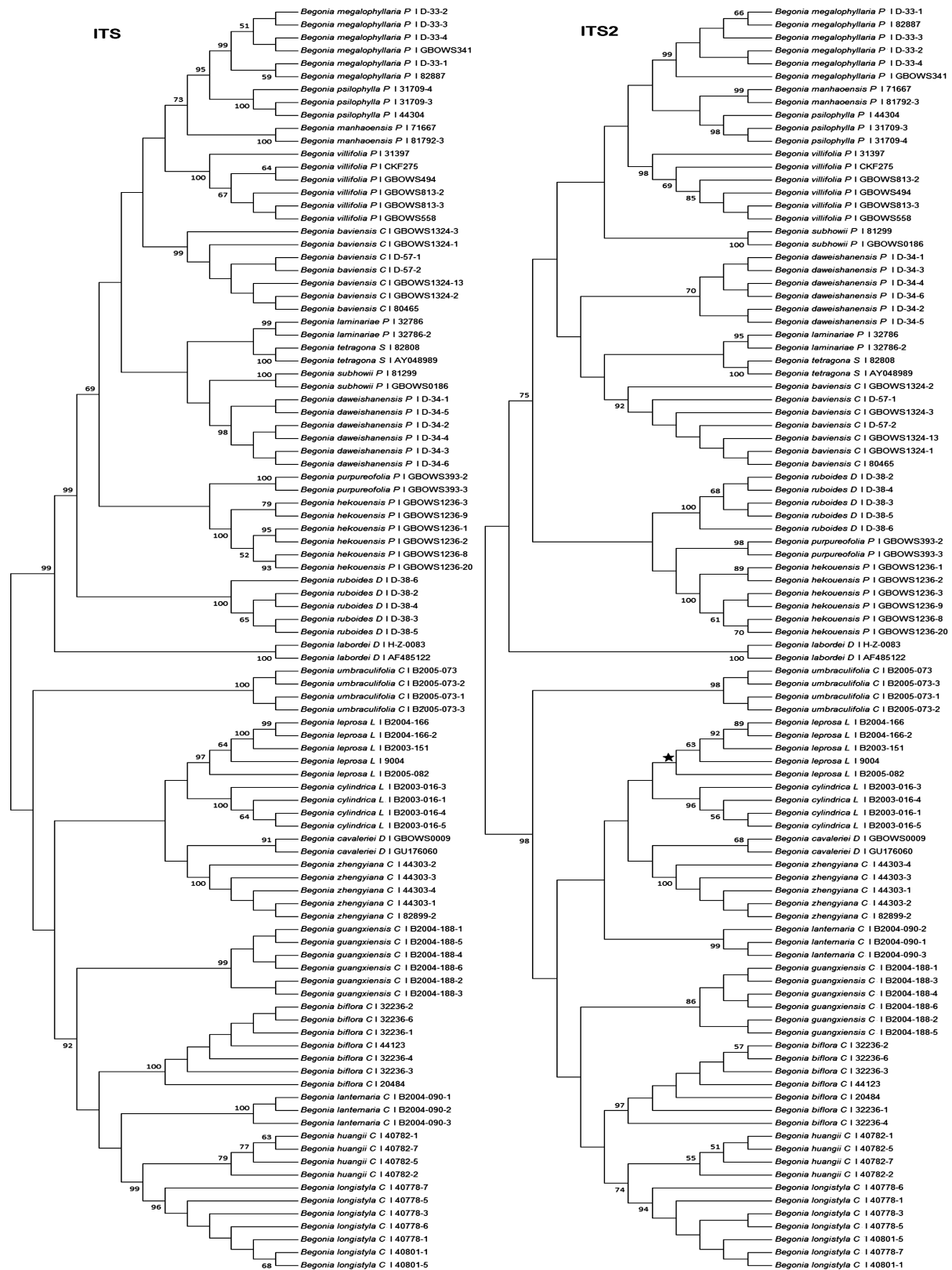


图2 ITS 和 ITS2 分析得到秋海棠属的 NJ 树, 分支上显示高于 50% 支持率, ★ ITS2 未能正确鉴定的种

Fig. 2 NJ tree based on ITS and ITS2 sequences for *Begonia*. Bootstrap values (>50%) are shown above the relevant branches. ★ Species not discriminated using ITS2

Whitlock 等, 2010; Hollingsworth, 2011; Hollingsworth 等, 2011)。

近年来, ITS 片段的一部分 ITS2 在一些类群中已被证实具有很好的鉴定效果 (Gao 和 Chen, 2009; Chen 等, 2010; Shi 等, 2011; Xiang 等, 2011; Yao 等, 2011; Li 等, 2011)。本研究中, ITS2 种内距离小于 ITS、种间距离大于 ITS, 存在“barcoding gap”, 物种分辨率 (96%) 和各种支持率与 ITS 相比虽然稍有降低, 但如果 ITS2 能够克服 ITS 引物通用性低以及比对困难等问题 (Chen 等, 2010; Liu 等, 2010; Hollingsworth 等, 2011), 那么 ITS2 可以替代 ITS 作为秋海棠属植物的 DNA 条形码, 是 ITS 的一个有效的补充片段。

综上所述, 叶绿体基因 *rbcL*, *matK* 和 *trnH-psbA* 种内和种间变异小, 对秋海棠属植物的鉴别能力有限, 不适合作为秋海棠属 DNA 条形码鉴定的标准条码; ITS/ITS2 片段种内和种间变异大, 物种正确鉴定率高, 可考虑作为秋海棠属 DNA 条形码鉴定的标准条码。支持中国植物条形码研究组建议将核基因 ITS/ITS2 纳入种子植物 DNA 条形码核心片段中的观点。本研究中只涉及秋海棠属部分种类, 且大多分布在中国云南或广西, 因此, 对秋海棠属 DNA 条码的评价还有待于进一步更加全面的研究。我们期待随着植物 DNA 条形码的不断发展和新一代植物志 (iFlora) 的构建与实施, DNA 条形码鉴定技术与形态分类相辅相成, 能够实现秋海棠属植物快速、准确、便捷的鉴定。

致谢 爱丁堡皇家植物园的 Michael Moeller 博士、中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的曾春霞博士、中国西南野生生物种质资源库的郁文彬博士、中国科学院昆明植物研究所标本馆的魏志丹博士在文章修改和数据处理方面提出大量的宝贵意见和建议, 中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的林春艳、袁文斌、王磊、赵祥给予实验技术指导。

〔参 考 文 献〕

- Altschul SF, Gish W, Miller W *et al.*, 1990. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, **215** (3): 403—410
- Alvarez I, Wendel JF, 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29** (3): 417—434
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA *et al.*, 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29** (3): 435—455
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (31): 12794—12797
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM *et al.*, 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, **56** (2): 295—299
- Chen SL, Yao H, Han JP *et al.*, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *Public Library of Science One*, **5** (1): e8613
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15
- Du ZY, Qimike A, Yang CF *et al.*, 2011. Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 246—251
- Fay MF, Swensen SM, Chase MW, 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae) [J]. *Kew Bulletin*, **52** (1): 111—120
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR *et al.*, 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *Public Library of Science One*, **3** (7): e2802
- Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS *et al.*, 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 130—139
- Fu YM, Jiang WM, Fu CX, 2011. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 237—245
- Gao LM (高连明), Liu J (刘杰), Cai J (蔡杰) *et al.*, 2012. A synopsis of technical notes on the standards for plant DNA barcoding [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34** (6): 592—606
- Gao T, Chen SL, 2009. Authentication of the medicinal plants in Fabaceae by DNA barcoding technique [J]. *Planta Medica*, **75** (4): 417—417
- Gonzalez MA, Baraloto C, Engel J *et al.*, 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes [J]. *Public Library of Science One*, **4** (10): e7483
- Gu J, Su JX, Lin RZ *et al.*, 2011. Testing four proposed barcoding markers for the identification of species within *Ligustrum* L. (Oleaceae) [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 213—224
- Guo X, Simmons MP, But PPH *et al.*, 2011. Application of DNA barcodes in *Hedyotis* L. (Spermacoceae, Rubiaceae) [J]. *Jour-*

- nal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 203—212
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270** (1512): 313—321
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: *Cytochrome oxidase subunit I* divergences among closely related species [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **270**: 96—99
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS *et al.*, 2004. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *Public Library of Science Biology*, **2** (10): e312
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL *et al.*, 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (2): 439—457
- Hollingsworth PM, 2011. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (49): 19451—19452
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP, 2011. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *Public Library of Science One*, **6** (5): e19254
- Huang H (黄海), Li JS (李劲松), Fu AJ (符岸军) *et al.*, 2010. Screening of potential DNA barcoding markers in *Dendrobium* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops* (热带作物学报), **31** (10): 1669—1777
- Katoh K, Kuma K, Toh H *et al.*, 2005. MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment [J]. *Nucleic Acids Research*, **33** (2): 511—518
- Katoh K, Toh H, 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework [J]. *BioMed Central Bioinformatics*, **9**: 212
- Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plant: The coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region [J]. *Public Library of Science One*, **2** (6): e508
- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA *et al.*, 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (44): 18621—18626
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (23): 8369—8374
- Ku SM, Kono Y, Liu Y, 2008. *Begonia pengii* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China [J]. *Botanical Studies*, **49** (2): 167—175
- Ku SM, Liu Y, Peng CI, 2006. Four new species of *Begonia* sect. *Coelocentrum* (Begoniaceae) from limestone areas in Guangxi, China [J]. *Botanical Studies*, **47** (2): 207—222
- Ku SM, Peng CI, Liu Y, 2004. Notes on *Begonia* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae) from Guangxi, China, with the report of two new species [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **45** (4): 353—367
- Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S *et al.*, 2008a. A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa) [OL]. *Nature Precedings*, <http://hdl.handle.net/10101/npre.12008.11896.10101>
- Lahaye R, van der Bank M., Bogarin D *et al.*, 2008b. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105** (8): 2923—2928
- Li DZ, Gao LM, Li HT *et al.*, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (49): 19641—19646
- Li DZ (李德铎), Wang YH (王雨华), Yi TS (伊廷双) *et al.*, 2012. The next generation Flora: iFlora [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34** (6): 525—531
- Liu J, Moller M, Gao LM *et al.*, 2010. DNA barcoding for the discrimination of *Eurasian yews* (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11** (1): 89—100
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD *et al.*, 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8** (3): 480—490
- Peng CI, Ku SM, Leong WC, 2005a. *Begonia liuyanii* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **46** (3): 245—254
- Peng CI, Shui YM, Liu Y *et al.*, 2005b. *Begonia fangii* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **46** (3): 83—89
- Peng CI, Hsieh TY, Ngyuen QH, 2007. *Begonia kui* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from Vietnam [J]. *Botanical Studies*, **48** (1): 127—132
- Peng CI, Ku SM, Kono Y *et al.*, 2008a. Two new species of *Begonia* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae) from limestone areas in Guangxi, China: *B. arachnoidea* and *B. subcoriacea* [J]. *Botanical Studies*, **49** (4): 405—418
- Peng CI, Liu Y, Ku SM, 2008b. *Begonia aurantiflora* (sect. *Coelocentrum*, Begoniaceae), a new species from limestone areas in Guangxi, China [J]. *Botanical Studies*, **49** (1): 83—92
- Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD, 2010. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers [J]. *Molecular Ecology Resources*, **10** (4): 594—605
- Rieseberg LH, Wood TE, Baack EJ, 2006. The nature of plant spe-

- cies [J]. *Nature*, **440** (7083): 524—527
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **84** (8): 1120—1136
- Sass C, Little DP, Stevenson DW *et al.*, 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding marker for species identification of cycads [J]. *Public Library of Science One*, **2** (11): e1154
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP *et al.*, 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360** (1462): 1805—1811
- Shi LC, Zhang J, Han JP *et al.*, 2011. Testing the potential of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 261—266
- Shui YM (税玉民), Chen WH (陈文红), 2005. New data of sect. *Coelocentrum* (*Begonia*) in Begoniaceae [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **27** (4): 355—374
- Shui YM, Peng CI, Wu CY, 2002. Synopsis of the Chinese species of *Begonia* (Begoniaceae), with a reappraisal of sectional delimitation [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **43** (4): 313—327
- Sosef MSM, 1994. Studies in Begoniaceae V [D]. Netherlands: Wageningen Agricultural University (PhD), 1—306
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **24** (8): 1596—1599
- Tate JA, Simpson BB, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. *Systematic Botany*, **28** (4): 723—737
- Thomas DC, Hughes M, Phutthai T *et al.*, 2011. A non-coding plastid DNA phylogeny of Asian *Begonia* (Begoniaceae): Evidence for morphological homoplasy and sectional polyphyly [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **60** (3): 428—444
- Thompson ML, Thompson EJ, 1981. *Begonias, The Complete Reference Guide* [M]. New York: Times Books Press, 1—356
- White TJ, Bruns T, Lee S *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J *et al.* (eds.), *PCR Protocols: a Guide To Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, 315—322
- Whitlock BA, Hale AM, Groff PA, 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode [J]. *Public Library of Science One*, **5** (7): e11533
- Xiang XG, Zhang JB, Lu AM *et al.*, 2011. Molecular identification of species in Juglandaceae: A tiered method [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 252—260
- Yan HF, Hao G, Hu CM *et al.*, 2011. DNA barcoding in closely related species: A case study of *Primula* L. sect. *Proliferae* Pax (Primulaceae) in China [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 225—236
- Yao H, Song JY, Liu C *et al.*, 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *Public Library of Science One*, **5** (10): 370—375
- Zhang SD, Soltis DE, Yang Y *et al.*, 2011. Multi-gene analysis provides a well-supported phylogeny of Rosales [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **60** (1): 21—28
- Zhao LJ (赵丽嘉), Jia Y (贾渝), Zhou SL (周世良) *et al.*, 2010. The preliminary study on DNA barcoding of mosses—a case of part of genera of Meteoriaceae [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **32** (3): 239—249
- Zhao YM (赵月梅), Zhang L (张玲), 2011. Using DNA barcoding in genus *Tacca* (Dioscoreaceae) [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **33** (6): 674—682